

ЗИГАНШИНА ЭЛЬВИРА ЭМИЛЕВНА

**БИОКОНВЕРСИЯ ОТХОДОВ ПТИЦЕВОДСТВА АНАЭРОБНЫМИ  
СООБЩЕСТВАМИ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2016

Работа выполнена на кафедре микробиологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,  
зав. кафедрой микробиологии КФУ  
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: Дегтярева Ирина Александровна – доктор биологических наук, заведующая отделом агроэкологии и микробиологии, ФГБНУ «Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения» (г. Казань)

Васильченко Алексей Сергеевич – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории дисбиозов, ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (г. Оренбург)

Ведущая организация: ФГБУН Уфимский институт биологии Российской академии наук (г. Уфа)

Защита диссертации состоится «28» апреля 2016 г. в 13.00 на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседания ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «    » марта 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.**

Внимание различных научных групп направлено в сторону развития и внедрения новых способов утилизации органических отходов, среди которых анаэробная микробная конверсия биомассы с попутным синтезом биометана рассматривается как привлекательное решение утилизации больших масс данных отходов (Vacenetti et al., 2013; Li et al., 2013). Процесс микробной конверсии различной биомассы в отсутствие молекулярного кислорода подразделяют на гидролиз субстрата, ацидогенез, ацетогенез и финальную стадию – метаногенез. Первые три стадии анаэробной трансформации биомассы ведут гидролитические и ферментирующие представители бактериальных ассоциаций, тогда как ацетокластические, гидрогенотрофные и метилотрофные метаногены внутри архейных сообществ осуществляют метаногенез (Demirel, Scherer, 2008). Однако стадию метаногенеза могут ингибировать различные факторы, в числе которых ингибирование аммиаком ( $\text{NH}_3$ ) и ионами аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) рассматривается как наиболее частое (Chen et al., 2008). Известно, что синтрофное окисление ацетата (COA), протекающее при участии ацетат-окисляющих бактерий, с последующим гидрогенотрофным метаногенезом сменяет ацетокластический путь при высоком уровне  $\text{NH}_3$  в утилизируемом субстрате (Fotidis et al., 2014).

Микробная конверсия органических отходов различного происхождения также благоприятствует сокращению выбросов парниковых газов в атмосферу, а полученный эффлюент может быть использован в качестве высококачественных удобрений (Chamy et al., 2011; Vacenetti et al., 2013). Однако, несмотря на имеющиеся преимущества анаэробной конверсии отходов с получением биоэнергии, зачастую низкая стабильность работы анаэробных реакторов все еще препятствует коммерческому внедрению множества разработанных способов. На сегодняшний день выделяют, по крайней мере, следующие основные проблемы анаэробного процесса конверсии биомассы – низкая биодоступность некоторых перерабатываемых субстратов, ингибирование микробов высокими концентрациями  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  и  $\text{H}_2\text{S}$  (Costa et al., 2012; Yenigun, Demirel, 2013). Азот относится к макроэлементам и требуется в достаточно высоких концентрациях, как для развития бактерий, так и для метаногенных архей. Оптимальная концентрация  $\text{NH}_4^+$  обеспечивает достаточную буферную емкость перерабатываемого субстрата в анаэробных системах. Тем не менее, высокий уровень  $\text{NH}_4^+$  и в большей степени  $\text{NH}_3$  является самой распространенной причиной сбоя анаэробного процесса (Rajagopal et al., 2013). Различные факторы (в основном повышение температуры и pH) влияют на баланс  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  и ведут к увеличению концентрации  $\text{NH}_3$  и, следовательно, к повышению токсичности  $\text{NH}_3$  на анаэробные микроорганизмы, в особенности на ацетокластические метаногены (Garcia, Angenent, 2009).

Научные работы по устранению негативного влияния  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  на микроорганизмы ведутся различными исследователями, что подчеркивает актуальность данной области исследования (Costa et al., 2012; Niu et al., 2013a; Lv et al., 2014). Некоторые исследователи в качестве методов устранения

токсичного эффекта аммиака предлагают регулирование соотношения C:N в исходном субстрате (Shanmugam, Horan, 2009), контроль температурного режима анаэробной системы (Rajagopal et al., 2013) и уровня pH перерабатываемой смеси (Ho, Ho, 2012). В ряде работ показана возможность бактериальных и архейных сообществ адаптироваться к критическим концентрациям  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  (Angenent et al., 2002; Calli et al., 2005a), а также эффективность применения некоторых алюмосиликатных минералов в процессе анаэробной микробной конверсии остаточной биомассы (Montalvo et al., 2012). Однако, несмотря на отдельные достижения в развитии эффективных способов анаэробной конверсии отходов, содержащих азот в высоких концентрациях, проблема сбоя работы анаэробных реакторов по причине ингибирования микроорганизмов аммиаком требует разработки новых способов, направленных на стимуляцию микробного процесса деструкции биомассы с попутным синтезом биогаза, а также изучения микробных сообществ, вовлеченных в данный процесс.

В соответствии с вышеизложенным сформулирована цель и определены задачи настоящего исследования.

**Целью** настоящего исследования стали анализ процесса конверсии куриного помета в биогаз анаэробными микробными сообществами, расшифровка структуры и динамики сообществ в биореакторах при изменении концентрации вносимого субстрата, внесении алюмосиликатных цеолитов и ортофосфорной кислоты.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

1) Оценить влияние повышения нагрузки по органике при постоянном времени удерживания субстрата на производительность работы биореакторов, осуществляющих анаэробную микробную конверсию куриного помета, с определением основных параметров исходного процесса.

2) Оценить эффект внесения алюмосиликатных минералов (цеолитов) на процесс анаэробной микробной конверсии куриного помета с определением основных параметров исходного процесса.

3) Выявить изменения в структуре микробных сообществ биореакторов в ответ на увеличение нагрузки по органике и добавление алюмосиликатных минералов с использованием пиросеквенирования фрагментов гена 16S рибосомной РНК.

4) Оценить влияние повышения нагрузки по органике и снижения времени удерживания субстрата на производительность работы биореакторов, осуществляющих анаэробную микробную конверсию куриного помета, с определением основных параметров процесса.

5) Охарактеризовать эффект внесения ортофосфорной кислоты на процесс анаэробной микробной конверсии куриного помета с определением основных параметров исходного процесса.

6) Отследить динамику микробных ассоциаций биореакторов в ответ на увеличение нагрузки по органике, снижение времени пребывания субстрата в реакторах и внесение ортофосфорной кислоты с использованием пиросеквенирования фрагментов гена 16S рибосомной РНК.

**Научная новизна.** Получены новые данные в области структурной организации и динамики развития бактериальных и архейных ассоциаций, вовлеченных в анаэробную конверсию куриного помета, с применением метода высокопроизводительного пиросеквенирования генов 16S рРНК. Впервые показано, что аккумуляция  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  и летучих жирных кислот (ЛЖК), а также повышение pH в лабораторных биореакторах, спровоцированные повышением концентрации вносимого субстрата, вызывали изменения как в структуре бактериальных, так и метаногенных сообществ. Показано эффективное удаление  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  алюмосиликатными цеолитами (в концентрации 2.5 г л<sup>-1</sup>), что напрямую оказало положительное влияние на процесс вливания ЛЖК в метаногенез при высокой нагрузке по органике и стабилизировало анаэробный процесс при высоком уровне  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . Впервые показана целесообразность внесения умеренной концентрации ортофосфорной кислоты (1.4–18.0 мл 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  на 10 литров перерабатываемого субстрата) на стимуляцию микробного синтеза биометана. Впервые показан сдвиг бактериального сообщества, в частности, ослабление деятельности различных представителей фило *Bacteroidetes* и доминирование фило *Firmicutes* с *Erysipelotrichaceae* и *Clostridium* в роли преобладающих групп при анаэробной конверсии высоких концентраций куриного помета (2.8–3.5 Г<sub>ОСВ</sub> (органическое сухое вещество) л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup>). Обнаружено доминирование метаноархей гидрогенотрофного рода *Methanobacterium* при низкой нагрузке вносимого субстрата (до 2.0 Г<sub>ОСВ</sub> л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup>), а также при умеренных концентрациях  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  (до 1.9 г л<sup>-1</sup>) и ЛЖК (до 1.5 г л<sup>-1</sup>). С увеличением концентрации вносимого субстрата метаногены миксотрофного рода *Methanosarcina* детектировались как доминантные представители архейных ассоциаций лабораторных реакторов. Предположено ингибирование ацетокластического метаногенеза в анаэробных реакторах при повышении концентрации вносимого субстрата, сопровождавшимся повышением уровня  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  (свыше 3.0 г л<sup>-1</sup>), ЛЖК (свыше 3.0 г л<sup>-1</sup>) и pH (свыше 7.5). Получен банк данных рибосомных нуклеотидных последовательностей представителей доменов Бактерии и Археи, вовлеченных в анаэробную конверсию куриного помета.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в рамках диссертационной работы научные результаты вносят вклад в решение глобальной проблемы обезвреживания и переработки больших масс органических отходов. Научные результаты о структуре и развитии микробных сообществ, вовлеченных в анаэробную конверсию биомассы при высоком содержании  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  и ЛЖК, способствуют расширению знаний в области разнообразия и активности сложных микробных ассоциаций.

Полученные результаты с применением алюмосиликатных минералов и фосфорной кислоты с целью стабилизации анаэробного процесса и стимуляции синтеза биометана из биомассы с высоким содержанием азота означают неоспоримый вклад в решение вопроса повышения биодоступности трудноразлагаемого сырья. В перспективе разработанные методы смогут стать основой биотехнологий эффективной переработки и другой биомассы, содержащей критические концентрации  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ , например, отходов

свиноводства, а также субстратов с высоким содержанием протеинов – водорослевая биомасса, жмых, отходы скотобойни, где высокий уровень аммонийного азота является результатом высвобождения аминокрупп ( $-\text{NH}_2$ ) и образованием  $\text{NH}_3$ . При этом открываются возможности повышения эффективности совместной конверсии данных отходов с отходами различного профиля (солома, отходы перерабатывающего производства).

Кроме того, научные результаты проведенной работы дополнили информационные базы данных по разнообразию микроорганизмов. Так, нуклеотидные последовательности, полученные в рамках диссертационной работы, были депонированы в MG-RAST. Стоит отметить, что полное представление о структуре микробных сообществ, развивающихся в экстремальных условиях, имеет практическое значение для перспективного выделения микроорганизмов с различными ферментативными активностями. Результаты настоящей работы апробированы в лабораторных установках и в перспективе готовы к внедрению на птицефабриках.

Выявленная динамика развития микробных сообществ в ответ на многофакторные изменения анаэробного процесса (повышение нагрузки по органике, изменение времени удерживания субстрата, присутствие цеолитов, внесение дополнительного источника фосфора) является интересным объектом для понимания взаимодействий и связей между членами микробных ассоциаций. Таким образом, полученные данные представляют интерес как с практической точки зрения в качестве профилактических мер стабильного анаэробного процесса, стратегий устранения сбоя микробной конверсии сложных субстратов в промышленных реакторах, так и с точки зрения получения новых данных в области микробной экологии.

**Методология и методы исследования.** Поставленные задачи решены с применением микробиологических, молекулярно-биологических и физико-химических методов исследования (полимеразная цепная реакция, гель-электрофорез, 454 пиросеквенирование, секвенирование, газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, ионная хроматография, pH-метрия). Результаты исследований обработаны общеизвестными математическими методами статистики.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1) Показана целесообразность внесения алюмосиликатных цеолитов ( $2.5 \text{ г л}^{-1}$ ) в реакторы непрерывного перемешивания для удаления повышенных концентраций свободного аммиака и ионов аммония, образуемых в процессе анаэробной конверсии куриного помета;

2) Выявлен положительный эффект внесения ортофосфорной кислоты (в диапазоне концентраций  $1.4\text{--}18.0 \text{ мл } 85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$  на 10 литров перерабатываемого субстрата) в анаэробные реакторы на процесс образования биогаза из куриного помета при повышенной нагрузке по органике ( $2.3\text{--}2.8 \text{ Г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ );

3) Обнаружено доминирование неизвестных бактериальных членов порядка *Bacteroidales* и метаноархей рода *Methanobacterium* при низкой концентрации вносимого субстрата (до  $2.0 \text{ Г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ ), а также при

умеренных концентрациях аммонийного азота (до  $1.9 \text{ г л}^{-1}$ ) и летучих жирных кислот (до  $1.5 \text{ г л}^{-1}$ ) в реакторах;

4) Выявлено преобладание бактерий семейства *Erysipelotrichaceae* и рода *Clostridium*, а также метаногенов рода *Methanosarcina* при повышенной концентрации вносимого субстрата ( $2.8\text{--}3.5 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ ), сопровождавшейся повышением уровня аммонийного азота (свыше  $2.7 \text{ г л}^{-1}$ ), летучих жирных кислот (свыше  $2.3 \text{ г л}^{-1}$ ) и pH (свыше 7.5).

**Достоверность результатов** проведенных исследований подтверждается большим объемом многократных экспериментов, выполненных и проанализированных на современных высокоточных приборах, а также опубликованием результатов в научных журналах с рецензированием ведущими учеными в данной области.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы представлены на VIII всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз–Россия 2015» (Новосибирск, 2015), IX всероссийском форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах» (Санкт-Петербург, 2015), всероссийской научной конференции «Биоразнообразие и механизмы адаптации организмов в условиях естественного и техногенного загрязнения» (Сибай, 2015), XII международной научно-практической конференции «Научные идеи в науках о Земле» (Москва, 2015), I международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015), II International conference on «Biogas Microbiology» (Швеция, 2014), IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014), I международной интернет-конференции «Энергетика в современном мире» (Казань, 2013), II интернет-конференции «Грани науки – 2013» (Казань, 2013), II всероссийской интернет-конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2011), I всероссийской с международным участием школе-конференции молодых учёных «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (Екатеринбург-Пермь, 2011).

**Место выполнения работы и личный вклад соискателя.** Работа выполнена лично автором на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Автором диссертации совместно с научным руководителем разработаны основные направления исследования, сформулирована цель, поставлены задачи исследовательской работы. Диссертантом лично проанализированы и обработаны литературные данные, выполнены лабораторные исследования, проведены анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы, оформлялись и готовились материалы для публикации в научных журналах. Ряд экспериментов по анаэробной обработке куриного помета проводились в лаборатории Института органической и физической химии имени А.Е. Арбузова. Некоторые исследования, направленные на идентификацию состава микробных сообществ с применением 454 пиросеквенирования, выполнены в междисциплинарном

центре геномных и протеомных исследований Казанского федерального университета.

**Связь работы с научными программами.** Исследования выполнены в рамках Российской Правительственной Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета среди ведущих мировых научно-исследовательских центров, а также поддержаны государственным контрактом №12081p/22874 (2013-2014 гг) и проектами №14-04-31694 и №14-08-31768 Российского фонда фундаментальных исследований (2014-2015 гг).

**Публикация результатов исследования.** По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, среди которых 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения и списка цитированной литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, включает 12 таблиц, 19 рисунков. Библиография включает 110 наименований.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Анаэробная конверсия куриного помета в лабораторных анаэробных реакторах.** В таблицах 1–4 представлены основные параметры анаэробной переработки куриного помета в четырех лабораторных реакторах непрерывного перемешивания со скоростью перемешивания 60 об мин<sup>-1</sup>. Внесение новой порции субстрата, также как и выгрузку переработанной смеси проводили ежедневно. Удельный выход биогаза, его состав и pH измеряли ежедневно, а количество органических кислот и аммония – 2–3 раза в неделю.

Во всех 12-литровых реакторах с рабочим объемом 10 л поддерживали мезофильную температуру (38°C). Куриный помет и коровий навоз (коровий навоз служил основным источником анаэробных микроорганизмов) были отобраны на птицефабрике Зеленодольского района и на коровьей ферме Буинского района Республики Татарстан (Россия) соответственно. Первоначально коровий навоз (4.6 кг) и водопроводную воду (5.4 л) смешивали и вносили в реакторы, а после 30 сут брожения, когда удельный выход биогаза из навоза прекратился, реакторы начинали снабжать исключительно куриным пометом (с этого времени начинали отсчет экспериментов). Таким образом, экспериментальный период анаэробной конверсии куриного помета в реакторах R\_1 и R\_2 (серия первых экспериментов) составил 94 сут, а в R\_3 и R\_4 (серия вторых экспериментов) – 137 сут.

Анаэробная конверсия куриного помета в реакторах при повышении нагрузки по органике и внесении алюмосиликатных цеолитов. На рисунке 1 отображен характер изменения нагрузки по органике (НПО) с 1.0 до 3.5 г<sub>ОСВ</sub> л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup> при постоянном времени удерживания субстрата, равном 35 сут. Реактор R\_1 на 11 сут эксперимента с целью частичного удаления аммонийного и



аммиачного азота, токсичного для микроорганизмов в повышенных концентрациях, был дополнительно снабжен 25 г цеолитами («Merck 5704», 0.3 нм, ~2 мм), в то время как контрольный реактор R\_2 функционировал без внесения минералов на протяжении всего эксперимента. Цеолиты фиксировались в пористом нейлоновом мешке внутри реактора и имели следующий состав (%): Si (SiO<sub>2</sub>) –17.8 (38.0), Al (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) –17.1 (32.2) и K (K<sub>2</sub>O) –24.7 (28.9). На 25 сут, 57 сут и 94 сут эксперимента из реакторов дополнительно были отобраны образцы с целью анализа структуры и динамики развития микробных сообществ.

Анаэробная конверсия куриного помета в реакторах при изменении режима внесения субстрата и внесении ортофосфорной кислоты. В серии вторых экспериментов реактор R\_3 выступал в качестве контрольного, а анаэробная система R\_4 функционировала с внесением фосфорной кислоты (85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) на протяжении 32 суток (61–92 сут). В реактор R\_4 вносили по 1.4 мл 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> с 61 сут по 74 сут и по 2.0 мл 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> с 75 сут по 92 сут. На рисунке 6 представлена схема изменения нагрузки по органике и времени удерживания субстрата в реакторах R\_3 и R\_4. НПО в R\_3 постепенно увеличивали с 1.0 до 3.2 г<sub>ОСВ</sub> л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup> к концу экспериментального периода. В реакторе R\_4 НПО увеличивали с 1.0 до 2.8 г<sub>ОСВ</sub> л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup> к 99 сут эксперимента, далее куриный помет не вносили в реактор в период 100–102 сут по причине стремительной аккумуляции органических кислот. После этого периода НПО в реакторе доводили до 1.5 г<sub>ОСВ</sub> л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup> и поддерживали на этом уровне до 110 сут. На следующем этапе (111–115 сут) концентрацию органических веществ, вносимых в систему, повышали до 2.3 г<sub>ОСВ</sub> л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup>, а далее НПО увеличивали до 3.2 г<sub>ОСВ</sub> л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup> и поддерживали на этом уровне до конца эксперимента. Обе системы функционировали при ВУ субстрата в 50 сут в период 1–89 сут; после этого ВУ снижали до 40 сут и поддерживали на этом уровне до конца экспериментального периода. На 77 сут, 99 сут и 127 сут из обоих реакторов дополнительно были отобраны образцы с целью анализа динамики развития микробных сообществ.

**Методы.** Содержание сухого вещества (СВ) в образцах исследовали после их высушивания в сухожаровом шкафу при 105°C в течение 1 ч. Содержание сухого органического вещества (СОВ) анализировали после высушивания при 105°C в течение 1 ч с последующим прокаливанием в муфельной печи при 550°C 3 ч. Состав биогаза, а именно количественное содержание CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>S, определяли с использованием газового анализатора GA 2000 (Keison, Великобритания). Общую концентрацию органических кислот измеряли титрованием 0.025–0.1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в диапазоне pH от 4.5 до 3.5. Концентрацию растворимых фосфатов, уровень ацетата и пропионата анализировали на хроматографе Dionex (США), оснащенном колонками IonPac AS9-NC или IonPac AS11. Концентрацию общего аммонийного азота (NH<sub>4</sub>-N), как сумму свободного аммиачного азота (NH<sub>3</sub>-N) и ионизированного аммонийного азота (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N), определяли в жидкой фазе путем дистилляции и поглощения в H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> с последующим титрованием H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Концентрацию аммиачного азота высчитывали, используя показатели общего

аммонийного азота, pH и температуры. Статистическую обработку данных анаэробной конверсии проводили с использованием программы электронных таблиц. Результаты работы выражены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение ( $n=3$ ). Статистически достоверным уровнем значимости принимали  $p<0.05$ .

Выделение и очистка тотальной ДНК. Тотальную ДНК экстрагировали и очищали с использованием FastDNA spin kit for soil (MP Biomedicals, США) согласно инструкциям производителя. Общее количество экстрагированной и очищенной ДНК измеряли с использованием Qubit dsDNA BR assay kit и Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, США).

454 пиросеквенирование ампликоновых библиотек. Фрагменты гена бактериальной 16S рРНК (~500 п.н) амплифицировали методом ПЦР с геномной ДНК баркодированными праймерами 27F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 533R (TTACCGCGGCTGCTGGCAC), в то время как фрагменты гена архейной 16S рРНК (~450 п.н.) амплифицировали баркодированными праймерами 349F (GYGCASCAGKCGMGAAW) и 806R (GGACTACVSGGGTATCTAAT). Для каждого образца были поставлены три независимые реакции с использованием High Fidelity PCR System FastStart (Roche, Branford, США). Полученные ампликоны для каждого образца объединяли и очищали с использованием Agencourt AMPure XP system (Beckman Coulter, Brea, США). Очищенные ампликоны были дополнительно проверены с применением DNA kit и Agilent 2100 Bioanalyzer system (Santa Clara, США). Флуориметрическое количественное определение, подготовку библиотеки ампликонов и пиросеквенирование ампликонов проводили в соответствии с методическим руководством GS Junior (Roche). Нуклеотидные последовательности, полученные в данной работе, были задепонированы в MG-RAST под номерами: 4602384.3–4602396.3, 4602398.3, 4602400.3–4602405.3, 4625156.3, 4625157.3.

Биоинформатический анализ. Нуклеотидные последовательности генов бактериальной и архейной 16S рРНК далее были обработаны и проанализированы с помощью пакета QIIME версии 1.8.0 в соответствии с протоколами QIIME. Нуклеотидные последовательности были сгруппированы в операционные таксономические единицы на уровне 97% сходства гена бактериальной и архейной 16S рРНК. Бета-разнообразие микробных сообществ лабораторных реакторов оценивали, используя анализ главных координат (principal coordinates analysis, PCoA), известный также как метрическое шкалирование. Дополнительно неметрическое многомерное шкалирование (nonmetric multidimensional scaling, NMDS) с применением индекса сходства Брея-Кёртиса (Bray-Curtis similarity index) было применено для анализа бактериальных и архейных прочтений 454 пиросеквенирования. Взаимосвязь основных технологических параметров анаэробного процесса с составом микробных сообществ лабораторных реакторов была установлена с помощью алгоритма “envfit”, предоставленного пакетом “vegan”. Значимость отдельных параметров анаэробного процесса на результаты NMDS была протестирована с помощью теста Монте-Карло.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1 Влияние повышения нагрузки по органике и внесения цеолитов на развитие анаэробных микробных сообществ, вовлеченных в конверсию куриного помета

#### 1.1 Параметры анаэробной конверсии куриного помета в реакторах

Производительность лабораторных реакторов R\_1 и R\_2 была оценена биологической деструкцией органического вещества с попутным синтезом биометана, оценкой концентрации летучих жирных кислот (ЛЖК), уровня общего аммонийного и аммиачного азота.

На рисунке 1 представлена схема изменения нагрузки по органике при стабильном времени удерживания (ВУ) субстрата в реакторах. Реактор R\_1 функционировал с внесением цеолитов в количестве  $2.5 \text{ г л}^{-1}$ . В обеих системах повышение НПО с  $1.0$  до  $2.0 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  сопровождалось повышением удельного выхода биогаза ( $438\text{--}469 \text{ мл г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$  с содержанием метана  $\sim 55\%$  на 25 сут; Таблицы 1 и 2). Следующее повышение НПО до  $2.3 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  приводило к резкому снижению выхода биогаза, что может быть объяснено реакцией микроорганизмов на увеличение концентрации вносимого субстрата. После дальнейшего повышения НПО до  $3.5 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  значения выхода биогаза из реакторов были сопоставимы и достигли  $350$  и  $358 \text{ мл г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$  в R\_1 и R\_2 на конец экспериментального периода соответственно. Содержание метана в биогазе из обоих реакторов увеличилось до  $57\text{--}59\%$  на 94 сут эксперимента.

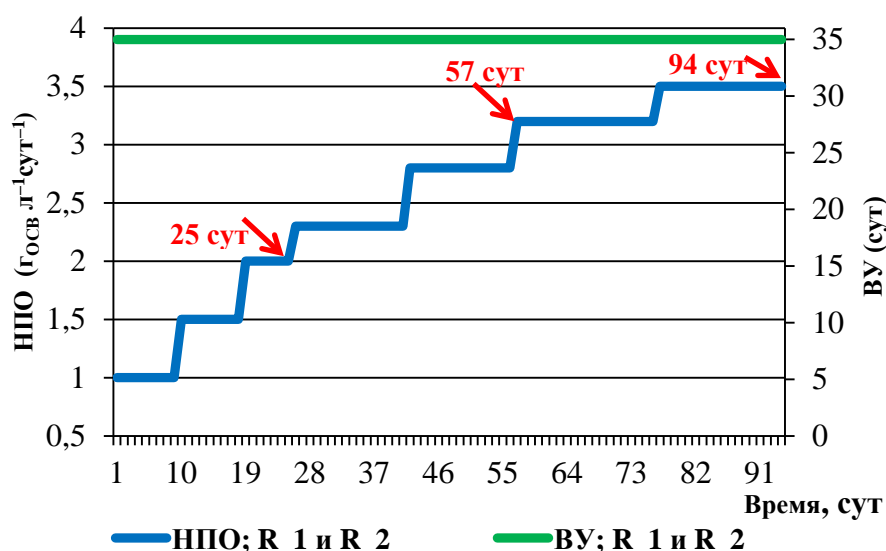


Рисунок 1 – Схема изменения нагрузки по органике при постоянном времени удерживания субстрата в реакторах R\_1 и R\_2 (стрелками указаны точки отбора проб для анализа состава микробных сообществ).

Ключевым индикатором стабильной анаэробной конверсии биомассы является концентрация ЛЖК. В случае ингибирования их утилизации они накапливаются в реакторах на высоком уровне, что может привести к дисбалансу всего анаэробного процесса (Schmidt et al., 2014). Количество ЛЖК в R\_1 было сравнительно выше количества кислот в R\_2 при повышении НПО с  $2.0$  до  $2.8 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ . Однако повышение НПО до  $3.5 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  сопровождалось резким повышением уровня ЛЖК в R\_2 вплоть до  $8.89 \text{ г л}^{-1}$  с последующим снижением их количества. Несмотря на высокий уровень ЛЖК,

Таблица 1 – Параметры работы лабораторного анаэробного реактора, функционировавшего с внесением цеолитов

Реактор	Сутки	НПО (г <sub>ОСВ</sub> л <sup>-1</sup> сут <sup>-1</sup> )	ВУ (сут)	Выход биогаза (мл г <sup>-1</sup> <sub>ОСВ</sub> )	CH <sub>4</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> S (ppm)	Орг. кислоты (г л <sup>-1</sup> )	pH	NH <sub>4</sub> -N (г л <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> -N (мг л <sup>-1</sup> )
R_1	3	1.0	35	310	52.0	47.6	1261	1.28±0.05	6.91	0.26±0.02	4±1.0
	7	1.0	35	526	53.1	46.2	1305	1.39±0.05	7.05	0.55±0.03	10±1.2
	14	1.5	35	486	55.8	43.9	3283	1.02±0.08	7.24	0.96±0.04	26±2.3
	21	2.0	35	465	55.3	44.1	3738	1.23±0.11	7.35	1.18±0.05	41±1.5
	<b>25</b>	<b>2.0</b>	<b>35</b>	<b>438</b>	<b>55.4</b>	<b>43.9</b>	<b>4148</b>	<b>1.51±0.09</b>	<b>7.37</b>	<b>1.86±0.05</b>	<b>63±2.5</b>
	32	2.3	35	285	49.8	49.4	4655	2.95±0.18	7.21	1.68±0.07	41±2.0
	44	2.8	35	306	58.0	41.3	4285	2.89±0.15	7.30	2.23±0.06	74±2.3
	50	2.8	35	383	60.3	39.1	3636	2.48±0.08	7.57	3.16±0.04	176±3.8
	<b>57</b>	<b>3.2</b>	<b>35</b>	<b>365</b>	<b>56.3</b>	<b>43.0</b>	<b>4289</b>	<b>2.31±0.09</b>	<b>7.52</b>	<b>2.68±0.04</b>	<b>134±3.7</b>
	64	3.2	35	332	57.9	41.2	4217	2.53±0.18	7.52	2.92±0.08	216±2.8
	71	3.2	35	338	54.1	45.0	4721	4.05±0.11	7.49	3.33±0.04	156±4.1
	79	3.5	35	345	52.7	46.5	4789	4.37±0.10	7.58	3.71±0.05	166±2.0
	84	3.5	35	390	57.6	41.7	4717	3.60±0.14	7.68	4.09±0.27	289±3.0
	87	3.5	35	399	57.7	41.4	4700	3.55±0.07	7.70	4.41±0.10	325±3.9
	<b>94</b>	<b>3.5</b>	<b>35</b>	<b>350</b>	<b>56.5</b>	<b>42.6</b>	<b>4648</b>	<b>2.48±0.09</b>	<b>7.78</b>	<b>4.21±0.05</b>	<b>367±3.7</b>

Таблица 2 – Параметры работы лабораторного анаэробного реактора, функционировавшего без внесения цеолитов

Реактор	Сутки	НПО (г <sub>ОСВ</sub> л <sup>-1</sup> сут <sup>-1</sup> )	ВУ (сут)	Выход биогаза (мл г <sup>-1</sup> <sub>ОСВ</sub> )	CH <sub>4</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> S (ppm)	Орг. кислоты (г л <sup>-1</sup> )	pH	NH <sub>4</sub> -N (г л <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> -N (мг л <sup>-1</sup> )
R_2	3	1.0	35	322	51.5	48.2	1126	1.38±0.04	6.94	0.19±0.02	2±1.1
	7	1.0	35	532	51.2	48.0	1145	1.59±0.05	7.01	0.66±0.03	11±1.0
	14	1.5	35	481	54.1	45.4	2508	1.45±0.05	7.11	0.89±0.08	19±2.5
	21	2.0	35	460	55.2	44.2	3157	1.14±0.07	7.28	1.16±0.08	34±2.5
	<b>25</b>	<b>2.0</b>	<b>35</b>	<b>469</b>	<b>54.6</b>	<b>44.8</b>	<b>3163</b>	<b>1.36±0.04</b>	<b>7.35</b>	<b>1.74±0.09</b>	<b>57±1.5</b>
	32	2.3	35	323	51.8	47.5	4264	1.87±0.06	7.41	1.95±0.11	57±3.8
	44	2.8	35	330	56.7	42.6	3675	1.83±0.08	7.47	2.23±0.06	86±4.0
	50	2.8	35	408	57.0	42.6	3387	1.95±0.05	7.48	2.78±0.23	127±3.2
	<b>57</b>	<b>3.2</b>	<b>35</b>	<b>374</b>	<b>56.2</b>	<b>43.2</b>	<b>4308</b>	<b>2.26±0.05</b>	<b>7.55</b>	<b>2.95±0.09</b>	<b>157±2.9</b>
	64	3.2	35	393	56.5	42.5	4412	2.77±0.09	7.58	2.91±0.10	224±1.9
	71	3.2	35	329	53.6	46.0	4625	4.61±0.05	7.54	3.70±0.11	194±3.8
	79	3.5	35	293	49.8	49.6	4717	7.34±0.11	7.48	4.07±0.26	190±2.7
	84	3.5	35	315	53.1	46.1	4673	8.89±0.05	7.52	4.47±0.09	224±3.8
	87	3.5	35	418	53.0	45.8	4650	8.32±0.12	7.77	4.98±0.31	303±3.7
	<b>94</b>	<b>3.5</b>	<b>35</b>	<b>358</b>	<b>58.8</b>	<b>40.5</b>	<b>3842</b>	<b>3.58±0.08</b>	<b>7.8</b>	<b>4.55±0.07</b>	<b>416±2.7</b>

Параметры функционирования реакторов, когда была исследована структура микробных сообществ, указаны полужирным шрифтом.

значения pH повышались с ~6.9 до ~7.8 к концу эксперимента в обеих системах. Это указывает на то, что куриный помет и высвобождавшийся аммиак из исходного субстрата способствовали повышению pH внутри анаэробных реакторов (Таблицы 1 и 2).

Количество  $\text{NH}_4\text{-N}$  и  $\text{NH}_3\text{-N}$  в R\_1 к концу эксперимента увеличилось от начального  $0.26 \text{ г л}^{-1}$  и  $4 \text{ мг л}^{-1}$  до  $4.21 \text{ г л}^{-1}$  и  $367 \text{ мг л}^{-1}$  соответственно. Значения  $\text{NH}_4\text{-N}$  и  $\text{NH}_3\text{-N}$  в R\_2 были выше и достигли  $4.55 \text{ г л}^{-1}$  и  $416 \text{ мг л}^{-1}$  соответственно (94 сут; Таблицы 1 и 2). Такие высокие концентрации аммонийного азота рассматриваются как ингибирующие для анаэробного процесса (Chen et al., 2008). Различия в уровнях аммонийного азота в двух реакторах, вероятно, были связаны с внесением цеолитов в первый реактор с целью связывания токсичных  $\text{NH}_3$  и  $\text{NH}_4^+$ . Более низкие значения  $\text{NH}_4\text{-N}$ , обнаруженные в R\_1, в сравнении с R\_2 оказали положительное влияние на процесс утилизации ЛЖК в первом реакторе при высокой нагрузке по органике, что предполагает положительное влияние внесения цеолитов на анаэробный процесс переработки субстрата, богатого азотом.

## 1.2 Динамика развития бактериальных сообществ в реакторах

Бактериальное разнообразие в анаэробных реакторах было исследовано методом пиросеквенирования гена бактериальной 16S рРНК. На рисунке 2 представлена динамика развития представителей домена Бактерии в R\_1 и R\_2 на уровне фил с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце. На рисунке 3 представлена динамика развития бактериальных сообществ в реакторах R\_1 и R\_2, где таксономическая принадлежность последовательностей представлена на уровне родов или более высокого таксона с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце. Доминирующими филами в обеих системах были *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Synergistetes* и *Tenericutes*. Представители остальных фил присутствовали в реакторах в незначительном количестве, в частности были обнаружены члены фил *Spirochaetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Thermotogae*, *Chloroflexi* и кандидатов на подразделения TM6, WPS-2, WS1.

В реакторе R\_1, функционировавшем с внесением цеолитов, бактериальное сообщество было неустойчивым в течение всего экспериментального периода. Обращает внимание на себя высокий процент представителей филы *Bacteroidetes* (64% относительного распространения). Представителей филы *Bacteroidetes* детектировали в роли основных членов бактериальных сообществ и в некоторых других анаэробных системах (Ho et al., 2013; Li et al., 2013). Следующими крупными филотипами оказались представители фил *Firmicutes* (16%) и *Synergistetes* (14%) в первой точке отбора проб. С увеличением концентрации вносимого субстрата от  $1.0$  до  $3.5 \text{ г осв л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ , сопровождавшимся накоплением аммонийного азота и ЛЖК, а также увеличением pH, численность доминирующих в первой точке представителей *Bacteroidetes* значительно уменьшилась с 64% до 21%. В то же время бактерии филы *Firmicutes* стали преобладающими таксонами – с 16% до 66% (Рисунок 2).

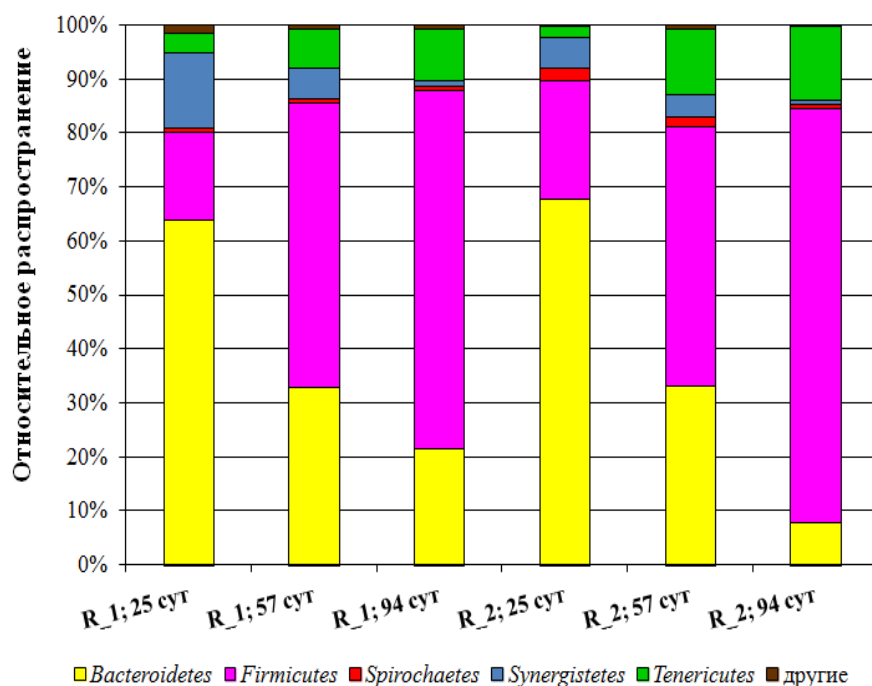


Рисунок 2 – Динамика развития бактериальных сообществ в R\_1 и R\_2 на уровне фил (с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце; представители с процентом встречаемости менее 1% отнесены к группе «другие»).

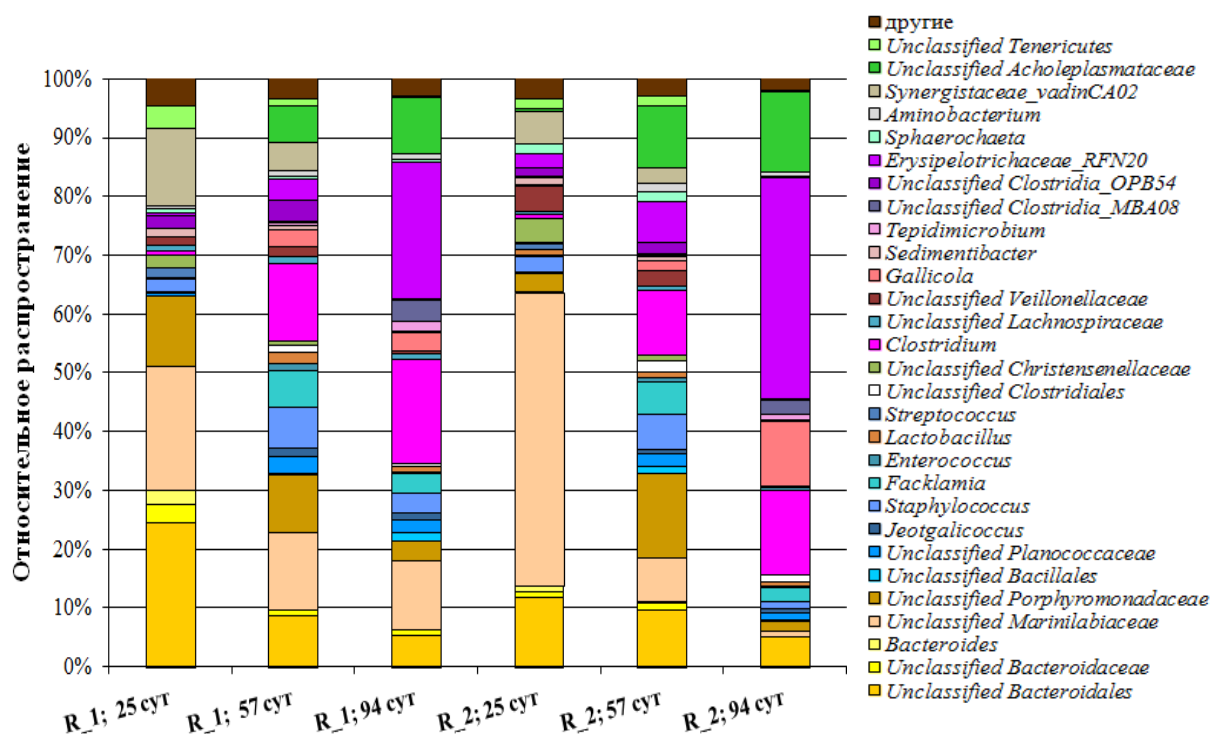


Рисунок 3 – Динамика развития бактериальных сообществ в реакторах R\_1 и R\_2 представлена на уровне родов или более высокого таксона (с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце; представители с процентом встречаемости менее 1% отнесены к группе «другие»).

В реакторе R\_1 внутри филы *Bacteroidetes* основными таксонами в начале эксперимента оказались неклассифицированные члены *Bacteroidales* (24%), а также неизвестные *Marinilabiaceae* (21%), *Porphyromonadaceae* (12%) и *Bacteroidaceae* (3%) внутри порядка *Bacteroidales* (Рисунок 3). Известно, что члены семейства *Marinilabiaceae* занимают весомое положение в анаэробных сообществах субстратов, богатых питательными веществами (Zhao et al., 2011). Представители семейства *Porphyromonadaceae* синтезируют различные органические кислоты из углеводов и белков (Chen et al., 2005; Ueki et al., 2006). Внутри филы *Firmicutes* было зафиксировано повышение доли неизвестных *Erysipelotrichaceae* и *Clostridium* в третьей точке отбора проб (до 23% и 18% соответственно). Семейство *Erysipelotrichaceae* включает анаэробных микроорганизмов с хемоорганотрофным метаболизмом, способных продуцировать кислоты из глюкозы или других сахаров (Ramasaamy et al., 2013). Представителей гидролитического порядка *Clostridiales* часто детектируют в роли доминантных представителей микробных ассоциаций в различных анаэробных системах (Li et al., 2013; Smith et al., 2013). Данные строгие анаэробы способны производить молекулярный водород (Das et al., 2001), а некоторые виды *Clostridiales* эффективно участвуют в биodeградации целлюлозы (Fontes et al., 2010). Известно также, что представители класса *Clostridia* (например, *Clostridium ultunense*) являются важными участниками синтрофного окисления ацетата (СОА, альтернативный метаболический путь метанизации ацетата, заменяющий ацетокластический метаногенез при высоком уровне аммиака в перерабатываемом субстрате) (Schnürer et al., 2008; Ziganshin et al., 2013).

Как и в реакторе R\_1, бактериальный консорциум в реакторе R\_2, функционировавшем без внесения цеолитов, изменялся в сторону преобладания бактерий филы *Firmicutes* в процессе эксперимента. В ходе повышения нагрузки по органике до 3.5 г<sub>ОСВ</sub> л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup> доминирующей филлой оказалась *Firmicutes* (с 22% до 77% от общего числа последовательностей) с неизвестными членами семейства *Erysipelotrichaceae* (до 38%), членами родов *Clostridium* (до 15%) и *Gallicola* (до 11%) (на 94 сут; Рисунок 3). В нашей работе повышение доли рода *Clostridium* могло быть связано с наличием целлюлозной биомассы в курином помете в виде древесной подстилки и компонентов корма, а также могло быть обусловлено их потенциальным участием в СОА в обеих системах при высоком уровне аммиака в перерабатываемом субстрате. С другой стороны, доля бактерий изначально мажорного таксона *Bacteroidetes* резко снизилась с 68% до 8% к концу эксперимента (Рисунок 2).

Бактерии семейства *Acholeplasmataceae* внутри филы *Tenericutes* количественно возросли от общего разнообразия, в то время как члены *Synergistaceae* количественно уменьшились на конец экспериментального периода в обеих системах (Рисунок 3). Доля представителей других бактериальных филотипов оставалась невелика в обоих реакторах в течение экспериментов (менее 1–2%).

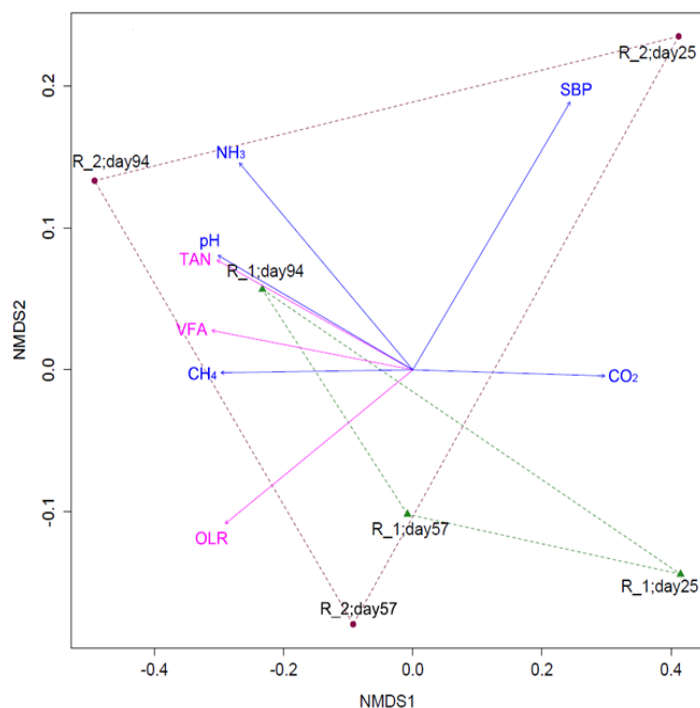


Рисунок 4 – NMDS диаграмма ампликонов гена бактериальной 16S рРНК образцов из R\_1 и R\_2. Стрелки пурпурного цвета – корреляционные векторы разнообразия бактериальных сообществ и параметров анаэробного процесса ( $\text{NH}_4\text{-N}$  (TAN), ЛЖК (VFA) и НПО (OLR)) со значимостью факторов  $p < 0.01$ . Синие стрелки – корреляционные векторы разнообразия бактериальных сообществ и параметров анаэробного процесса со значимостью факторов  $0.01 < p < 0.05$  ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ , pH, выход биогаза (SBP)).

Для оценки развития бактериальных ассоциаций реакторов было также применено неметрическое многомерное шкалирование (Рисунок 4). Из диаграммы видно, что образцы первых точек отбора проб реакторов R\_1 и R\_2 сильно разбросаны относительно друг друга в пределах NMDS диаграммы, а образцы, отобранные на 57 сут и 94 сут эксперимента, расположились относительно близко друг к другу. Ключевыми параметрами, повлиявшими на структуру бактериальных сообществ в ходе анаэробной конверсии отходов птицеводства в обоих реакторах, оказались значения НПО,  $\text{NH}_4\text{-N}$ , ЛЖК ( $p < 0.01$ ), а также уровень pH и значения  $\text{NH}_3\text{-N}$  ( $0.01 < p < 0.05$ ) (Рисунок 4).

### 1.3 Динамика развития архейных сообществ в реакторах

Разнообразие архейных ассоциаций в анаэробных реакторах, утилизировавших куриный помет с постепенным увеличением нагрузки по органике с 1.0 до 3.5  $\text{ГОСВ л}^{-1}\text{сут}^{-1}$ , было исследовано методом пиросеквенирования ампликонов гена 16S рибосомной РНК. На рисунке 5 представлена динамика развития представителей домена Археи реакторов R\_1 и R\_2 с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце. Однако стоит отметить, что среди последовательностей детектировали и представителей домена Бактерии, а именно представителей фило *Verrucomicrobia* (до 3.5% в первой точке первого реактора).

Следует отметить, что архейные сообщества обоих реакторов были менее разнообразны, чем бактериальные, и представители фило *Euryarchaeota* доминировали на протяжении всего эксперимента, в то время как фила *Crenarchaeota* была представлена немногочисленно. Внутри *Euryarchaeota* члены семейств *Methanobacteriaceae* и *Methanosarcinaceae* были мажорными с преобладающими родами *Methanobacterium* и *Methanosarcina* соответственно.



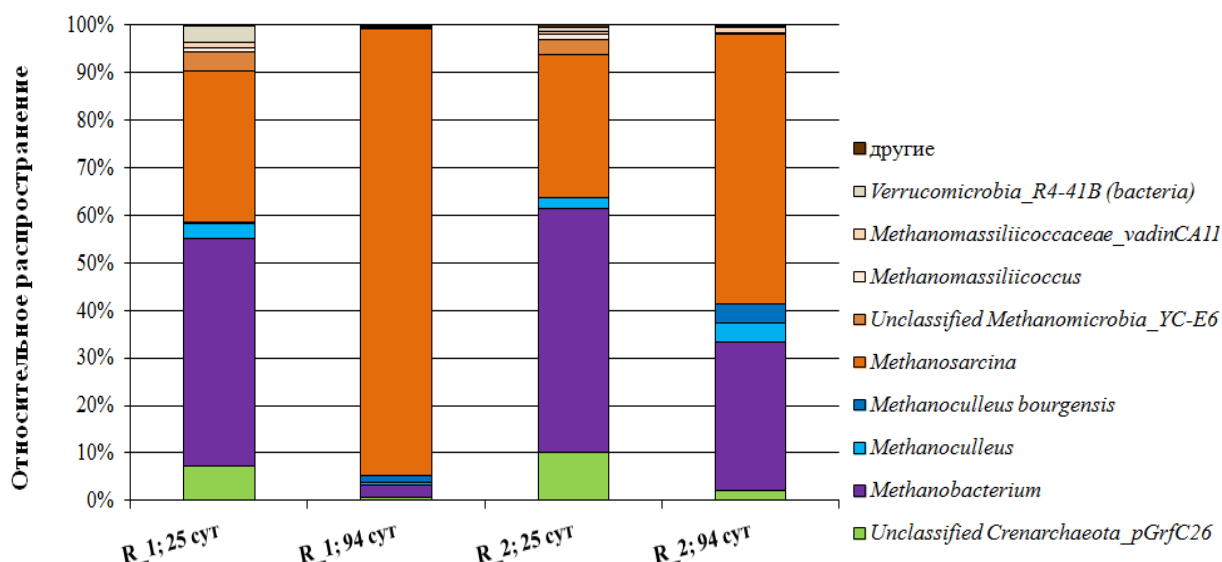


Рисунок 5 – Динамика развития архейных сообществ в реакторах R\_1 и R\_2. Таксономическая принадлежность последовательностей представлена на уровне видов или более высокого таксона (с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце; представители с процентом встречаемости менее 1% отнесены к группе «другие»).

Как и в случае с разнообразием бактериального сообщества в реакторе, функционировавшем с внесением цеолитов, архейное сообщество характеризовалось как нестабильное в ходе экспериментального периода и изменилось значительно в сравнении с сообществом архей в реакторе, функционировавшем без внесения цеолитов (Рисунок 5). Так, доля представителей гидрогенотрофного семейства *Methanobacteriaceae* значительно снизилась, а доля членов семейства *Methanosarcinaceae* повысилась. Стоит отметить, что среди представителей *Methanosarcinaceae* отмечают как наличие ацетокластических, так гидрогенотрофных и метилотрофных метаногенных архей (Demirel, Scherer, 2008). В первой точке отбора проб, когда нагрузка по органике в обоих реакторах была на уровне  $2.0 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ , общая численность членов строго гидрогенотрофного рода *Methanobacterium* была относительно равной – 48% и 51% в R\_1 и R\_2 соответственно; такая же тенденция отмечалась относительно обилия представителей рода *Methanosarcina* – около 32% и 30% в тех же образцах соответственно. С повышением НПО относительная численность рода *Methanosarcina* значительно увеличилась (до 94% и 57% в R\_1 и R\_2 соответственно). Интересно, что вместе с этим детектировали и резкое снижение доли строго гидрогенотрофных метаногенных архей в биореакторе, работавшем с внесением цеолитов (от 55% до 5%), в то время как численность данного рода в R\_2 осталась на относительно высоком уровне (до 39%). Кроме того, доля членов филы *Crenarchaeota* снизилась с 7–10% до 1–2% в обоих реакторах на конец эксперимента (Рисунок 5).

Метаногены порядка *Methanomicrobiales*, в частности представители рода *Methanoculleus*, рассматриваются как важные партнеры COA (Schnürer et al., 1999; Ziganshin et al., 2013). Однако как в реакторе R\_1, так и в R\_2 доля

семейства *Methanobacteriaceae* в образцах первого отбора проб преобладала над долей *Methanomicrobiaceae*. С увеличением концентрации вносимого субстрата доля *Methanobacterium* в реакторах R\_1 и R\_2 сильно снизилась до 3% и 31% соответственно; в то время доля *Methanosarcina* значительно возросла до 94% и 57% в R\_1 и R\_2 соответственно. Увеличение пропорции членов рода *Methanosarcina* наблюдалось параллельно с увеличением членов бактерий рода *Clostridium*. Количественное возрастание бактерий рода *Clostridium* в обоих реакторах могло быть связано с их участием в СОА при высоких концентрациях аммиака. Schnürer и Nordberg (Schnürer, Nordberg 2008) описали переход на СОА, как на альтернативный метаболический путь метанизации ацетата, при концентрациях аммонийного азота в субстрате выше  $3 \text{ г л}^{-1}$ . В ряде работ члены рода *Methanosarcina* были рассмотрены как гидрогенотрофные партнеры синтрофного окисления ацетата (Karlsson et al., 2012; Но et al., 2013). Возможно, поступление ацетата в метаногенез в реакторе R\_1 при высоких значениях нагрузки по органике шло через СОА с участием *Methanosarcina* в роли доминирующего гидрогенотрофного партнера. В то же время в реакторе R\_2 водород мог потребляться представителями родов *Methanobacterium*, *Methanoculleus*, *Methanosarcina*. Тем не менее, мы также не исключаем возможность участия рода *Methanosarcina* и в ацетокластическом метаногенезе.

## **2 Влияние повышения нагрузки по органике и снижения времени удерживания субстрата, а также внесения фосфорной кислоты на развитие анаэробных микробных сообществ, вовлеченных в конверсию куриного помета**

### **2.1 Параметры анаэробной конверсии куриного помета в реакторах**

Серия экспериментов была направлена на выявление эффекта увеличения НПО и уменьшения ВУ на эффективность анаэробной конверсии куриного помета с высоким содержанием азота в лабораторных реакторах R\_3 и R\_4 (схема эксперимента представлена на рисунке 6). Кроме того, было оценено влияние внесения фосфорной кислоты на производительность реактора R\_4 с параллельной оценкой развития микробных сообществ, участвующих в анаэробной переработке субстрата, богатого азотом и фосфором.

На стадии I (60 сут) куриный помет вносили в реакторы с целью изучения эффективности анаэробного процесса при возрастании НПО от  $1.0$  до  $2.3 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  при постоянном ВУ в 50 сут. Относительно повышенный удельный выход биогаза детектировали в системах при значениях НПО в  $1.0 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  (до  $450\text{--}460 \text{ мл г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$ ), что может быть следствием высокого уровня деструкции биомассы. За 60-суточный экспериментальный период значения рН в обоих реакторах возросли с  $\sim 6.7$  до  $\sim 7.5$ , предполагая, что куриный помет и выделяемый аммиак способствовали повышению уровня рН. На данной стадии детектировали накопление  $\text{NH}_4\text{-N}$  в системах ( $2.57 \text{ г л}^{-1}$  в R\_3 и  $2.33 \text{ г л}^{-1}$  в R\_4, 58 сут), а также возрастание уровня ЛЖК, что послужило причиной спада синтеза биогаза (Таблицы 3 и 4).

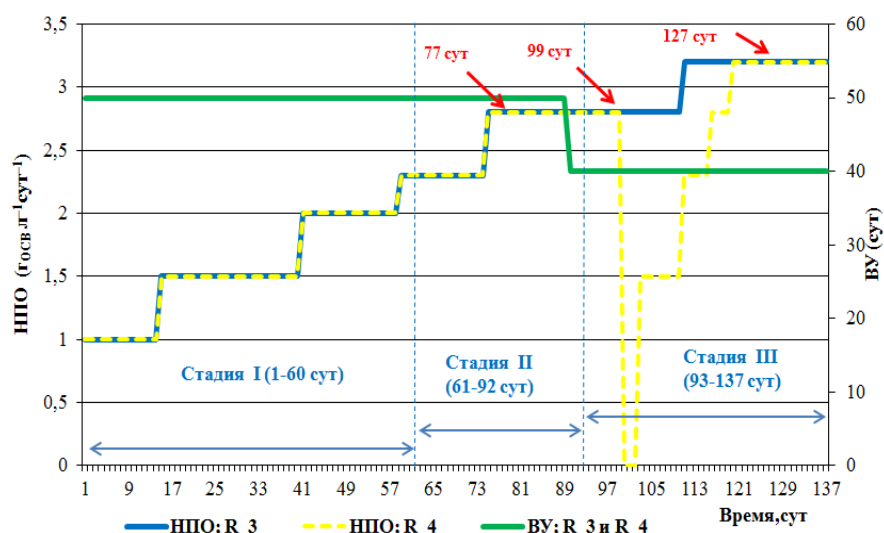


Рисунок 6 —  
Схема изменения нагрузки по органике и времени удерживания субстрата в реакторах R\_3 и R\_4 (стрелками указаны точки отбора проб для анализа микробных сообществ).

На стадии II (32 сут) НПО была увеличена до  $2.8 \text{ гОСВ л}^{-1}\text{сут}^{-1}$ , а 50-сут ВУ было сокращено до 40 сут в обоих реакторах. Стоит отметить повышение уровня аммонийного азота в обеих системах (до  $3.70 \text{ г л}^{-1}$  в R\_3 и  $4.17 \text{ г л}^{-1}$  в R\_4, 85 сут). R\_4 был снабжен дополнительно 85%-ной фосфорной кислотой, тогда как реактор R\_3 функционировал без каких-либо дополнительных добавок. Внесение  $\text{H}_3\text{PO}_4$  вело к относительно высокому удельному выходу биогаза со значениями  $412\text{--}447 \text{ мл г}^{-1}\text{ОСВ}$  с 68 сут по 73 сут по сравнению со значениями синтеза биогаза в R\_3 ( $335\text{--}350 \text{ мл г}^{-1}\text{ОСВ}$ ); уровень pH в R\_4 упал до  $\sim 7.4$ , и уровень ЛЖК был также ниже в R\_4 на данном этапе. В связи с повышением НПО с 75 по 92 сут в реактор R\_4 вносили  $2.0 \text{ мл } 85\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ . Повышение НПО вело к снижению синтеза биогаза до  $284 \text{ мл г}^{-1}\text{ОСВ}$  в R\_3 и  $315 \text{ мл г}^{-1}\text{ОСВ}$  в R\_4 (77 сут). Относительно объемной продукции биогаза ее значения достигали 284 л из R\_4, а в R\_3 значительно ниже — 252 л течение стадии II, что доказывает эффективность внесения  $\text{H}_3\text{PO}_4$  при анаэробной конверсии куриного помета. Концентрации ЛЖК,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NH}_3\text{-N}$  и pH в R\_4 были сравнительно ниже в сравнении с детектированными в контрольном R\_3 (Таблицы 3 и 4).

На этапе III (45 сут), НПО достигала уровня  $3.2 \text{ гОСВ л}^{-1}\text{сут}^{-1}$  при ВУ в обоих реакторах 40 сут. Поскольку высокие концентрации фосфатов могут ингибировать анаэробный процесс (Lei et al., 2010; Wang et al., 2015), во избежание перегрузки фосфатами реактор R\_4 функционировал в отсутствие  $\text{H}_3\text{PO}_4$  на стадии III. Положительный эффект снижения ВУ на удельный выход биогаза детектировали в R\_3 ( $426 \text{ мл г}^{-1}\text{ОСВ}$  на 99 сут), в то время как после отмены внесения  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в R\_4 значения выхода биогаза сократились до  $268 \text{ мл г}^{-1}\text{ОСВ}$  на 99 сут. В контрольном реакторе ЛЖК более эффективно включались в метаногенез на данной стадии, в то время как органические кислоты в экспериментальном реакторе накапливались ( $4.81 \text{ г л}^{-1}$  в R\_3 против  $8.32 \text{ г л}^{-1}$  в R\_4 на 99 сут), что указывает на спад метаногенной активности в последнем реакторе. С целью избежания полного сбоя анаэробного процесса в R\_4 и оценки его способности к восстановлению после ингибирования метаногенеза, в реактор не вносили субстрат на протяжении 3 сут (100–102 сут).

Таблица 3 – Параметры работы лабораторного реактора, функционировавшего без внесения фосфорной кислоты

Реактор	Сутки	НПО ( $\Gamma_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ )	ВУ (сут)	Выход биогаза (мл $\Gamma^{-1}_{\text{ОСВ}}$ )	CH <sub>4</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> S (ppm)	Орг. кислоты (г л <sup>-1</sup> )	pH	NH <sub>4</sub> -N (г л <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> -N (мг л <sup>-1</sup> )
R_3	3	1.0	50	309	50.0	49.1	1300	1.41±0.05	6.71	0.42±0.01	5±2.1
	14	1.0	50	460	53.7	45.7	2535	0.94±0.04	7.04	0.58±0.04	9±2.5
	29	1.5	50	400	54.2	45.0	3306	2.15±0.06	7.20	1.72±0.01	42±4.6
	41	2.0	50	245	52.1	47.2	4075	3.51±0.05	7.39	2.32±0.05	87±2.4
	51	2.0	50	453	58.9	40.4	3516	4.11±0.23	7.45	2.51±0.05	108±5.8
	58	2.3	50	285	60.2	39.3	2937	1.61±0.10	7.53	2.57±0.02	132±5.7
	65	2.3	50	309	54.2	45.2	4273	2.42±0.07	7.54	2.97±0.06	202±11.0
	68	2.3	50	350	53.1	46.2	4410	2.48±0.05	7.49	2.98±0.09	206±16.0
	73	2.3	50	335	53.2	45.4	4644	2.32±0.11	7.54	3.18±0.07	184±14.0
	<b>77</b>	<b>2.8</b>	<b>50</b>	<b>284</b>	<b>53.8</b>	<b>45.2</b>	<b>4645</b>	<b>3.64±0.13</b>	<b>7.52</b>	<b>3.39±0.06</b>	<b>250±10.4</b>
	85	2.8	50	310	52.4	47.2	4238	5.37±0.06	7.55	3.70±0.05	198±7.0
	92	2.8	40	343	50.7	48.6	4656	6.85±0.31	7.60	3.63±0.09	190±6.2
	<b>99</b>	<b>2.8</b>	<b>40</b>	<b>426</b>	<b>59.1</b>	<b>39.5</b>	<b>3921</b>	<b>4.81±0.25</b>	<b>7.78</b>	<b>3.75±0.11</b>	<b>256±8.0</b>
	106	2.8	40	357	58.0	41.5	3874	3.11±0.04	7.79	4.34±0.08	372±4.1
	111	3.2	40	404	55.9	43.2	4239	2.92±0.09	7.74	4.58±0.04	369±15.0
	<b>127</b>	<b>3.2</b>	<b>40</b>	<b>366</b>	<b>54.6</b>	<b>44.5</b>	<b>4604</b>	<b>3.22±0.17</b>	<b>7.86</b>	<b>4.89±0.10</b>	<b>505±9.8</b>
	135	3.2	40	351	55.2	44.0	4725	3.51±0.11	7.88	4.93±0.09	521±5.0

Таблица 4 – Параметры работы лабораторного реактора, функционировавшего с внесением фосфорной кислоты

Реактор	Сутки	НПО ( $\Gamma_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ )	ВУ (сут)	Выход биогаза (мл $\Gamma^{-1}_{\text{ОСВ}}$ )	CH <sub>4</sub> (%)	CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> S (ppm)	Орг. кислоты (г л <sup>-1</sup> )	pH	NH <sub>4</sub> -N (г л <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> -N (мг л <sup>-1</sup> )
R_4	3	1.0	50	322	50.4	49.2	1201	1.51±0.02	6.71	0.38±0.03	5±1.2
	14	1.0	50	450	53.9	45.3	2557	1.24±0.02	7.01	0.53±0.02	8±3.4
	29	1.5	50	413	55.5	43.6	3388	2.09±0.04	7.21	1.79±0.04	44±2.2
	41	2.0	50	223	53.4	46.1	4289	2.62±0.31	7.38	2.30±0.05	85±3.3
	51	2.0	50	428	58.6	40.6	3451	3.90±0.06	7.43	2.50±0.07	103±2.1
	58	2.3	50	398	60.0	39.1	2968	1.58±0.07	7.57	2.33±0.06	131±3.2
	65	2.3	50	385	51.4	47.8	4051	1.78±0.07	7.63	3.05±0.08	194±2.2
	68	2.3	50	447	51.9	47.4	4430	2.27±0.04	7.43	3.29±0.07	167±9.6
	73	2.3	50	412	50.5	49.1	4350	2.01±0.09	7.41	3.38±0.01	139±8.5
	<b>77</b>	<b>2.8</b>	<b>50</b>	<b>315</b>	<b>50.0</b>	<b>49.1</b>	<b>4349</b>	<b>2.81±0.21</b>	<b>7.39</b>	<b>3.40±0.11</b>	<b>145±5.7</b>
	85	2.8	50	355	49.9	49.5	4353	4.55±0.11	7.39	4.17±0.10	157±4.5
	92	2.8	40	337	49.3	49.3	4831	5.49±0.09	7.32	3.41±0.08	110±4.0
	<b>99</b>	<b>2.8</b>	<b>40</b>	<b>268</b>	<b>53.5</b>	<b>44.6</b>	<b>4735</b>	<b>8.32±0.24</b>	<b>7.25</b>	<b>3.66±0.08</b>	<b>127±5.0</b>
	106	1.5	40	228	62.1	37.5	3968	6.04±0.06	7.65	4.23±0.02	281±29.2
	111	2.3	40	391	61.6	37.5	3748	3.82±0.12	7.74	4.44±0.07	328±10.2
	<b>127</b>	<b>3.2</b>	<b>40</b>	<b>398</b>	<b>57.8</b>	<b>41.2</b>	<b>4158</b>	<b>2.50±0.11</b>	<b>7.80</b>	<b>4.17±0.02</b>	<b>372±13.1</b>
	135	3.2	40	380	60.1	39.5	4304	2.99±0.21	7.81	4.28±0.04	403±24.0

Параметры функционирования реакторов, когда была исследована структура микробных сообществ, указаны полужирным шрифтом.

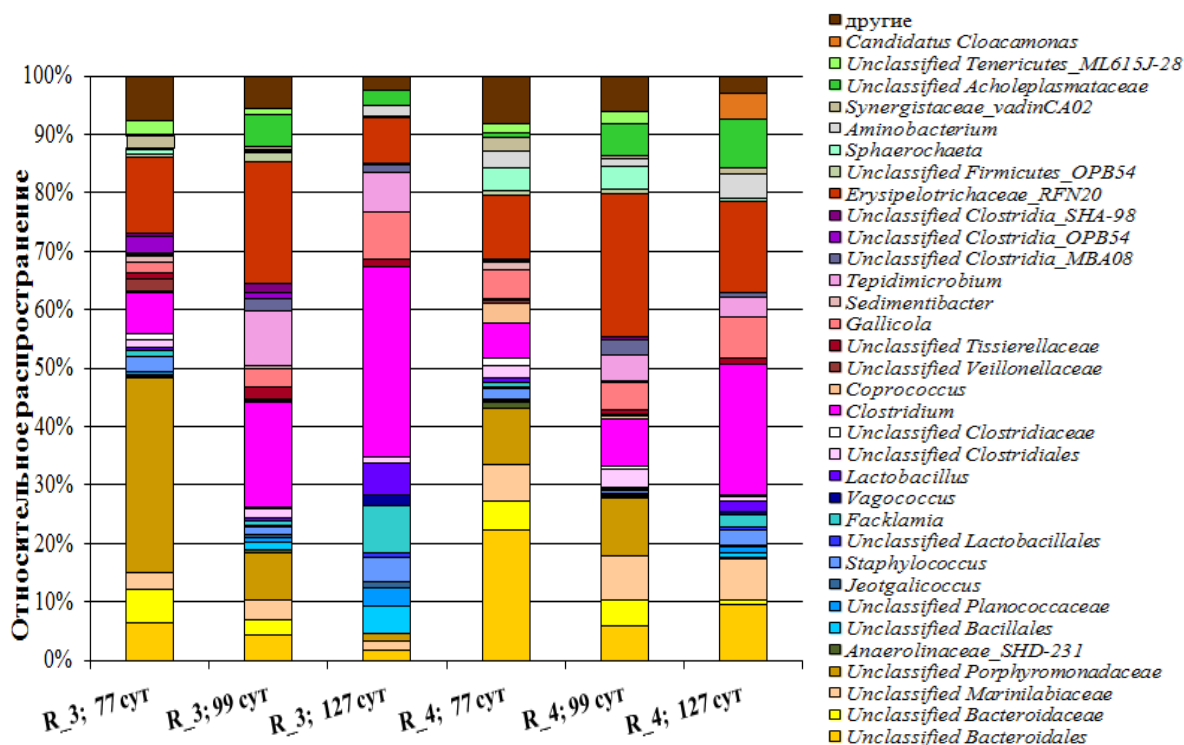
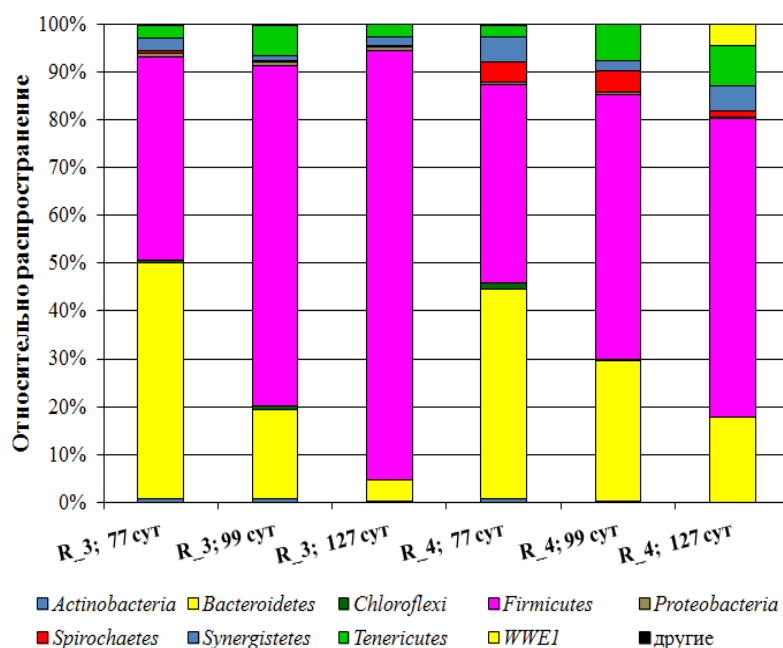
с последующим пошаговым восстановлением уровня НПО. На конец стадии III реактор R\_4 полностью восстановился и по основным параметрам функционирования был сопоставим с контрольным реактором R\_3. Уровень  $\text{NH}_4\text{-N}$  в системах была выше  $4.0 \text{ г л}^{-1}$ , предполагая, что потребление ацетата возможно протекало через путь бактериального синтрофного окисления ацетата (Schnürer, Nordberg, 2008) (Таблицы 3 и 4).

## 2.2 Динамика развития бактериальных сообществ в реакторах

Бактериальное разнообразие в реакторах R\_3 и R\_4 на стадиях II и III было исследовано методом пиросеквенирования фрагментов гена 16S рРНК. На рисунке 7 представлена динамика развития представителей домена Бактерии на уровне фил в биогазовых реакторах R\_3 и R\_4 с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце. На рисунке 8 представлена динамика развития бактериальных сообществ в реакторах R\_3 и R\_4, где таксономическая принадлежность последовательностей представлена на уровне родов или более высокого таксона с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце. В общей сложности, бактериальные сообщества в образцах обоих реакторов включали 13 фил, включая кандидаты на подразделения WWE1 и WPS-2.

Доминирующими филами в обеих системах на 77 сут эксперимента были *Bacteroidetes* с встречаемостью 49% и 44%, а также *Firmicutes* с встречаемостью 43% и 42% в R\_3 и в R\_4 соответственно. Доминирующая фила *Bacteroidetes* была представлена неизвестными членами семейства *Porphyromonadaceae* (33%), а также неизвестными *Bacteroidales* (6%), *Bacteroidaceae* (6%) и *Marinilabiaceae* (3%). В то же время в экспериментальном реакторе R\_4 неизвестные *Bacteroidales* были многочисленнее (22%), а доля представителей неизвестных *Porphyromonadaceae* была значительно ниже – 10% относительного разнообразия (Рисунок 8). Доминирование неизвестных членов *Bacteroidales* над неизвестными *Porphyromonadaceae* в R\_4 могло быть опосредовано внесением фосфорной кислоты. Отметим, что доминирующие представители внутри порядка *Bacteroidales* не были классифицированы ниже семейств, что ограничивает нас в установлении их функциональных особенностей в ходе анаэробной конверсии куриного помета.

С увеличением НПО до  $3.2 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  и снижением ВУ до 40 сут на смену основным членам филы *Bacteroidetes* пришли представители филы *Firmicutes* в обоих реакторах (90% и 62% на 127 сут в R\_3 и R\_4 соответственно). Стоит отметить увеличение доли представителей анаэробного рода *Clostridium* к концу эксперимента в обоих реакторах (до 33% и 23% для R\_3 и R\_4 соответственно). Кроме того, доля членов родов *Gallicola* и *Tepidimicrobium* в порядке *Clostridiales* также возросла в обоих реакторах на 127 сут эксперимента. Бактерия *Gallicola barnesae*, выделенная ранее из экскрементов и пищеварительного тракта кур, является анаэробной асахаролитической бактерией, способной утилизировать пурины, мочевую кислоту и другие азотсодержащие соединения с сопутствующим синтезом



уксусной, муравьиной, масляной кислот и аммиака (Schiefer-Ullrich et al., 1985; Ezaki et al., 2001). *Tepidimicrobium xylanilyticum* был выделен из шлама промышленных сточных вод и имеет способность к росту на различных углеводах и белковых соединениях. *T. xylanilyticum* синтезирует ацетат, этанол, бутират, водород из глюкозы, а также пропионат из ксилана (Niu et al., 2009). В данных реакторах, также как и в реакторах R\_1 и R\_2, предполагается участие

кlostридий в синтрофном окислении ацетата при высоком уровне аммиака. Внутри филы *Firmicutes* семейство *Erysipelotrichaceae* оценивалось как одна из доминантных групп в библиотеке ампликонов 16S рPHK в обеих системах – 21% и 25% относительного разнообразия в реакторах R\_3 и R\_4 на 99 сут, однако на 127 сут их доля снизилась до 8% и 16% соответственно.

Для оценки развития бактериальных ассоциаций реакторов было также применено неметрическое многомерное шкалирование (NMDS). NMDS диаграмма показала, что образцы из R\_3 отличались от образцов R\_4, а основным параметром изменения структуры бактериальных сообществ, ответственных за анаэробное сбраживание куриного помета в обоих реакторах, был высокий уровень  $\text{NH}_4\text{-N}$  ( $p < 0.01$ ). Корреляционный анализ также указал на то, что внесение фосфорной кислоты, уровень образуемого ацетата, пропионата и повышение нагрузки по органике ( $p < 0.05$ ) были следующими причинами изменения структуры бактериальной ассоциации в R\_4 (Рисунок 9).

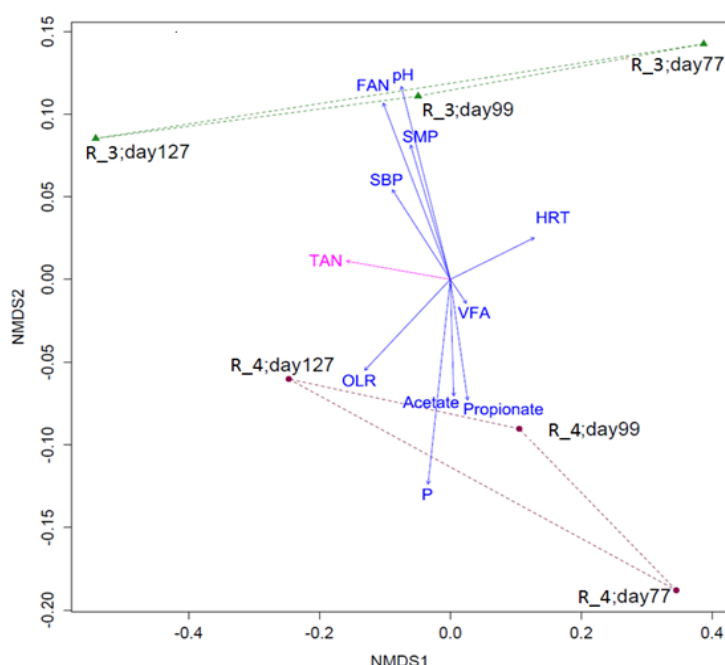


Рисунок 9 – NMDS диаграмма ампликонов гена бактериальной 16S рPHK образцов из реакторов R\_3 и R\_4. Стрелка пурпурного цвета – корреляционный вектор разнообразия бактериальных сообществ и параметров анаэробного процесса ( $\text{NH}_4\text{-N}$  (TAN)) со значимостью факторов  $p < 0.01$ . Синие стрелки – корреляционные векторы разнообразия бактериальных сообществ и параметров анаэробного процесса со значимостью факторов  $0.01 < p < 0.05$  (НПО (OLR), ВУ (HRT), ЛЖК (VFA), ацетат (acetate), пропионат (propionate), P,  $\text{NH}_3\text{-N}$  (FAN), pH, выход биогаза (SBP), выход метана (SMP)).

### 2.3 Динамика развития архейных сообществ в реакторах

На рисунке 10 отражена динамика развития представителей домена Археи реакторов R\_3 и R\_4 на протяжении стадий II и III эксперимента с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце. Стоит отметить, что среди последовательностей детектировали и представителей домена Бактерии, а именно представителей филы *Verrucomicrobia* до 9% и члена на подразделение *Candidatus Cloacamonas* до 13% в третьей точке экспериментального реактора.

К представителям домена Археи в обоих реакторах относились члены мажорной филы *Euryarchaeota* – рода *Methanosarcina* и *Methanobacterium*. В архейных сообществах первых точек отбора проб на 77 сут доминировали члены рода *Methanosarcina* (75% и 82% в реакторах R\_3 и R\_4 соответственно). Строго гидрогенотрофный род *Methanobacterium* был вторым крупным



таксоном в обеих системах – 18% и 12% в R\_3 и R\_4 на 77 сут соответственно. С увеличением НПО и уменьшением ВУ, доля рода *Methanosarcina* снизилась до 62% и 44% в R\_3 и R\_4 соответственно, однако данный таксон оставался доминирующим до конца эксперимента в обеих системах. Кроме того, детектировали возрастающую долю гидрогенотрофных метаногенов родов *Methanobacterium* и *Methanoculleus* в обоих реакторах на 127 сут эксперимента (до 36% в R\_3 и 30% в R\_4 соответственно; Рисунок 10).

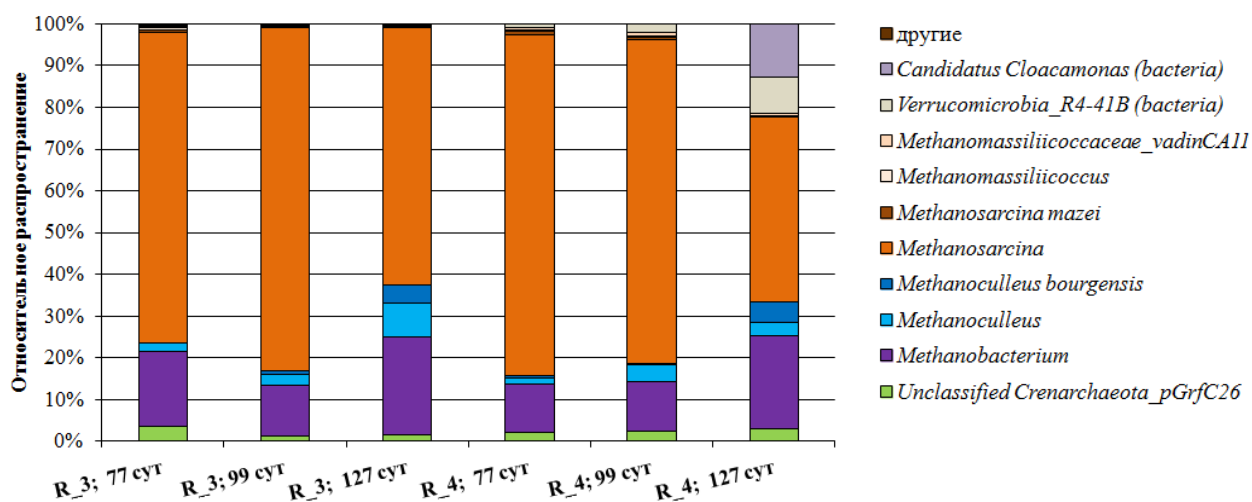


Рисунок 10 – Динамика развития архейных сообществ в реакторах R\_3 и R\_4 на уровне родов или более высокого таксона (с процентом встречаемости более 1% хотя бы в одном образце; представители с процентом встречаемости менее 1% отнесены к группе «другие»).

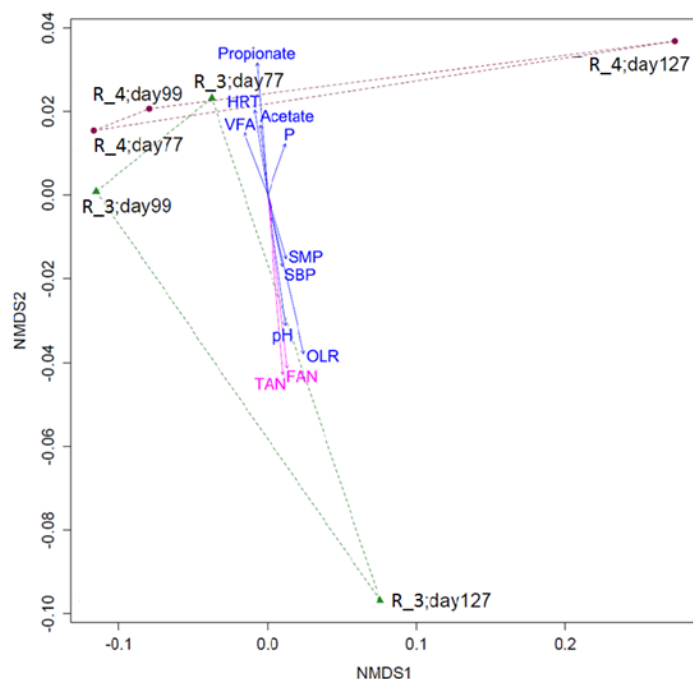


Рисунок 11 – NMDS диаграмма ампликонов гена архейной 16S рРНК образцов из реакторов R\_3 и R\_4. Стрелки пурпурного цвета – корреляционные вектора разнообразия архейных сообществ и параметров анаэробного процесса ( $\text{NH}_4\text{-N}$  (TAN) и  $\text{NH}_3\text{-N}$  (FAN)) со значимостью факторов  $p < 0.01$ . Синие стрелки – корреляционные векторы разнообразия архейных сообществ и параметров анаэробного процесса со значимостью факторов  $0.01 < p < 0.05$  (НПО (OLR), ВУ (HRT), ЛЖК (VFA), ацетат (acetate), пропионат (propionate), P, pH, выход биогаза (SBP), выход метана (SMP)).

На NMDS диаграмме видно, что четыре образца R\_3 и R\_4 были сгруппированы друг с другом, в то время как структура архейного сообществ последних двух образцов R\_3 и R\_4 значительно отличалась друг от друга (Рисунок 11). Основными параметрами, оказавшими влияние на сдвиг структуры архейного сообщества в R\_3 стали высокие концентрации  $\text{NH}_4\text{-N}$  и



$\text{NH}_3\text{-N}$  ( $p < 0.01$ ), а также нагрузка по органике и значения pH ( $p < 0.05$ ). Состав архейного консорциума в R\_4 также оказался под влиянием высокого уровня фосфатов ( $p < 0.05$ ).

Предположительно утилизация ацетата в обеих наших системах при высоких значениях аммонийного азота протекала через COA, например, с членами рода *Clostridium*, окисляющими ацетат до  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$ , и гидрогенотрофными партнерами – *Methanobacterium*, *Methanoculleus* и *Methanosarcina*. Тем не менее, мы не исключаем участие *Methanosarcina* и в ацетокластическом метаногенезе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведены исследования микробной конверсии отходов птицеводства сообществом анаэробных бактерий и архей. Обобщенные результаты работы можно представить следующим образом:

1) Каждая стадия увеличения нагрузки по органике при постоянном времени удерживания субстрата (куриного помета) в 35 суток сопровождалась кратковременным снижением удельного выхода биогаза, за которым следовала фаза стабилизации метаногенеза. После достижения концентрации вносимого органического вещества в  $3.5 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  значения удельного выхода биогаза из лабораторных реакторов стабилизировались и достигали  $\sim 400\text{--}420 \text{ мл г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$  с содержанием метана 57–59%. Кроме этого, увеличение концентрации вносимого субстрата сопровождалось повышением уровня ионов аммония, аммиака, летучих жирных кислот и pH в реакторах.

2) Максимальные 12% общего аммонийного азота, образуемого в процессе анаэробной трансформации куриного помета в биогаз, подвергались удалению цеолитами. Пониженные концентрации ионов аммония и аммиака в биореакторе, функционировавшем с внесением алюмосиликатных цеолитов, оказали положительное влияние на процесс вливания летучих жирных кислот в метаногенез при высокой нагрузке по органике в  $3.2\text{--}3.5 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ .

3) Различные неизвестные представители бактериального порядка *Bacteroidales* и архейного рода *Methanobacterium* доминировали при умеренном уровне ионов аммонийного азота (до  $1.9 \text{ г л}^{-1}$ ) и летучих жирных кислот (до  $1.5 \text{ г л}^{-1}$ ) в реакторах, в то время как повышение концентрации вносимого субстрата, сопровождавшееся повышением уровня аммонийного азота (свыше  $2.7 \text{ г л}^{-1}$ ), летучих жирных кислот (свыше  $2.3 \text{ г л}^{-1}$ ) и pH (свыше 7.5), приводило к преобладанию бактериальных таксонов *Erysipelotrichaceae*, *Clostridium*, *Acholeplasmataceae* и метаногенов рода *Methanosarcina*. Внесение цеолитов повлияло на значительное снижение доли строгих гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanobacterium*.

4) Каждый этап повышения нагрузки по органике при времени пребывания субстрата (куриного помета) в реакторе 50 суток сопровождался кратковременным снижением продукции биогаза. После акклиматизации микробных сообществ к повышенной концентрации субстрата процесс метаногенеза стабилизировался. После достижения концентрации вносимого органического вещества в  $3.2 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  и снижения времени пребывания

куриного помета в реакторе до 40 суток значения удельного выхода биогаза из лабораторного реакторов стабилизировались и достигали  $\sim 350\text{--}380 \text{ мл г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$  с содержанием метана 55–60%. Кроме этого, наблюдали возрастание уровня ионов аммония, аммиака, летучих жирных кислот и pH на конец экспериментального периода.

5) Внесение ортофосфорной кислоты в реактор (в диапазоне концентраций 1.4–18.0 мл 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  на 10 литров перерабатываемого субстрата) стимулировало синтез биометана из куриного помета с максимальным значением  $\sim 450 \text{ мл г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$  против  $\sim 350 \text{ мл г}^{-1}_{\text{ОСВ}}$  в реакторе, функционировавшем в отсутствие фосфорной кислоты (за период 61–74 суток при нагрузке по органике  $2.3 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ ), тогда как повышение концентрации ортофосфорной кислоты провоцировало затухание метаногенеза.

6) С увеличением вносимой органики (свыше  $2.8 \text{ г}_{\text{ОСВ}} \text{ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ ) и снижением времени удерживания субстрата (до 40 сут) представители филы *Firmicutes* с *Erysipelotrichaceae* и *Clostridium* в роли доминантных групп заменили членов филы *Bacteroidetes*. С увеличением вносимой органики и снижением времени удерживания субстрата доля рода *Methanosarcina* также снижалась в обоих реакторах, но оставалась доминантной группой на протяжении всего экспериментального периода. Присутствие ортофосфорной кислоты также влияло на изменения в структуре микробных сообществ.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах, включенных в список ВАК:

1. Ziganshina, E.E. Effect of the organic loading rate increase and the presence of zeolite on microbial community composition and process stability during anaerobic digestion of chicken wastes / E.E. Ziganshina, D.E. Belostotskiy, O.N. Ilinskaya, E.A. Boulygina, T.V. Grigoryeva, A.M. Ziganshin // Microb. Ecol. – 2015. – V. 70. – P. 948–960 (авт. 0.8 п.л.).
2. Belostotskiy, D.E. Impact of the substrate loading regime and phosphoric acid supplementation on performance of biogas reactors and microbial community dynamics during anaerobic digestion of chicken wastes / D.E. Belostotskiy, E.E. Ziganshina, M. Siniagina, E.A. Boulygina, V.A. Miluykov, A.M. Ziganshin // Bioresour. Technol. – 2015. – V. 193. – P. 42–52 (авт. 0.7 п.л.).
3. Зиганшин, А.М. Динамика развития метаногенного сообщества в процессе анаэробной утилизации отходов агропромышленного комплекса / А.М. Зиганшин, Э.Э. Зиганшина, С. Кляйнштаубер, Ю. Протер, О.Н. Ильинская // Acta Naturae. – 2012. – Т. 4. – С. 94–100 (авт. 0.2 п.л.).

### Другие публикации:

4. Зиганшина Э.Э., А.М. Зиганшин, О.Н. Ильинская. Исследование структуры метаногенных сообществ методом анализа полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов генов 16S рРНК и *mcrA*: учебно-методическое пособие. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2012. – 24 с.
5. Зиганшина, Э.Э. Эффект увеличения нагрузки по органике и внесения цеолитов на развитие микробного сообщества, ответственного за анаэробную переработку куриного помета / Э.Э. Зиганшина, Д.Е. Белостоцкий, О.Н. Ильинская, А.М.

- Зиганшин // VIII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз–2015». – Новосибирск, 2015. – С. 99.
6. Ваньков, П.Ю. Анализ структуры культивируемого бактериального сообщества кишечного тракта личинок некоторых представителей жуков-ксилофагов / П.Ю. Ваньков, Э.Э. Зиганшина, А.М. Зиганшин // VIII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз–2015». – Новосибирск, 2015. – С. 95.
  7. Зиганшина, Э.Э. Эффект внесения алюмосиликатных минералов на анаэробную конверсию куриного помета в биогаз / Э.Э. Зиганшина, Д.Е. Белостоцкий, О.Н. Ильинская, А.М. Зиганшин // IX Всероссийский форум студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах». – Санкт-Петербург, 2015. – С. 145.
  8. Зиганшина, Э.Э. Положительный эффект внесения ортофосфорной кислоты на процесс анаэробной конверсии отходов птицеводства / Э.Э. Зиганшина, Д.Е. Белостоцкий, О.Н. Ильинская, А.М. Зиганшин // IX Всероссийский форум студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах». – Санкт-Петербург, 2015. – С.146.
  9. Ваньков, П.Ю. Культивируемые бактерии пищеварительных трактов личинок жуков-ксилофагов / П.Ю. Ваньков, Э.Э. Зиганшина, Э.М. Ибрагимов, О.Н. Ильинская // Всероссийская научная конференция «Биоразнообразие и механизмы адаптации организмов в условиях естественного и техногенного загрязнения». – Сибай, 2015. – С. 31–34.
  10. Зиганшина, Э.Э. Микробные ресурсы для биологической очистки сточных вод порохового производства / Э.Э. Зиганшина, П.Ю. Ваньков, Э.М. Ибрагимов, А.М. Зиганшин // XII Международная научно-практическая конференция “Научные идеи в науках о Земле”. – Москва, 2015. – С. 274–275.
  11. Мирзиев, С.И. Сравнительный анализ методов нейтрализации ингибирования микробного сообщества биогазовых реакторов аммонийным азотом / С.И. Мирзиев, Д.Е. Белостоцкий, Э.Э. Зиганшина, А.М. Зиганшин // I Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – Казань, 2015 г. – С. 484.
  12. Belostotskiy, D.E. Microbial community diversity in biogas reactors digesting turkey, chicken and swine wastes / D.E. Belostotskiy, E.E. Ziganshina, R.V. Shushlyayev, V.A. Milyukov, P.Y. Vankov, A.M. Ziganshin // 2nd International Conference on Biogas Microbiology. – Uppsala, Sweden, 2014. – P. 2.
  13. Ваньков, П.Ю. Микробные сообщества анаэробных реакторов, утилизирующих отходы животноводства / П.Ю. Ваньков, Э.Э. Зиганшина, Д.Е. Белостоцкий, Р.В. Шушляев, В.А. Милуков, А.М. Зиганшин // IV Международная научно-практическая конференция “Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине”. – Казань, 2014. – С. 27.
  14. Багманова, А.Р. Микробная конверсия органического сырья с получением биотоплива / А.Р. Багманова, Э.Э. Зиганшина, А.М. Зиганшин // I Международная интернет-конференция “Энергетика в современном мире”. – Казань, 2013. – С. 3–5.
  15. Зиганшина, Э.Э. T-RFLP анализ в исследовании структуры микробных сообществ, участвующих в анаэробной утилизации отходов сельского хозяйства / Э.Э. Зиганшина, А.Р. Багманова, В.В. Туфатулин, А.М. Зиганшин // II Интернет-конференция “Грани науки – 2013”. – Казань, 2013. – С. 405–406.

16. Зиганшин, А.М. Утилизация органических отходов спиртового производства с получением биогаза / А.М. Зиганшин, Э.Э. Зиганшина // II Всероссийская интернет-конференция “Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии”. – Казань, 2011. – С. 370–372.
17. Зиганшина, Э.Э. Способ утилизации послеспиртовой барды с использованием биогазовой технологии / Э.Э. Зиганшина, А.М. Зиганшин // I Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых учёных «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии». – Екатеринбург-Пермь, 2011. – С. 13–15.

### **Благодарности**

Автор выражает благодарность и признательность научному руководителю д.б.н., профессору кафедры микробиологии КФУ Ольге Николаевне Ильинской за помощь при подготовке диссертационной работы. Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. А.М. Зиганшину за консультации и обсуждение полученных результатов, к.б.н. А.И. Колпакову за всестороннюю помощь, д.х.н. В.А. Милюкову и к.т.н. Д.Е. Белостоцкому за возможность проведения ряда экспериментов в лаборатории Института органической и физической химии имени А.Е. Арбузова. Диссертант выражает благодарность сотрудникам междисциплинарного центра геномных и протеомных исследований Казанского федерального университета.

Автор считает своим приятным долгом выразить искреннюю благодарность всем преподавателям и научным сотрудникам кафедры микробиологии КФУ.

E-mail автора: elvira051088@gmail.com

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru.